

# Best Available Copy



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer:

0 197 266  
A2

⑫

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑬ Anmeldenummer: 86102108.7

⑮ Int. Cl.<sup>4</sup>: C 12 Q 1/68  
G 01 N 33/52

⑭ Anmeldetag: 19.02.86

⑩ Priorität: 26.02.85 DE 3506703

⑯ Anmelder: SAGAX Instrument AB  
Nytorpsvägen 14  
S-183 53 Täby(SE)

⑭ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
15.10.86 Patentblatt 86/42

⑰ Erfinder: Nygren, Hakan  
Valbergsvägen 4 C  
S-427 00 Billdal(SE)

⑮ Benannte Vertragsstaaten:  
CH FR GB IT LI SE

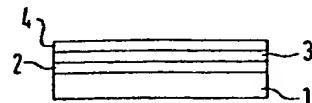
⑱ Erfinder: Stenberg, Manne  
Hedelundsvägen 5  
S-417 43 Göteborg(SE)

⑲ Verfahren und Träger zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren.

⑳ Vertreter: Nöth, Heinz, Dipl.-Phys.  
Patentanwalt Müllerstrasse 1  
D-8000 München 5(DE)

⑳ Ein Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren, bei dem die zu untersuchende flüssige Probe, welche denaturierte Nucleinsäure aufweist, mit einer lichtreflektierenden Trägeroberfläche in Berührung gebracht wird, die einen an dieser Oberfläche chemisch gebundenen Nucleinsäurestrang mit bestimmter Sequenz aufweist, wobei sich komplementäre Sequenzen der in der Probe befindlichen denaturierten Nucleinsäure mit dem am Träger fixierten Nucleinsäurestrang durch Hybridisierung vereinigen, und das Dickenwachstum der sich dabei auf der Trägeroberfläche bildenden organischen Schicht durch Vergleichsellipsometriemessung oder Änderung der Interferenzerscheinungen an der doppelschichtig ausgebildeten reflektierenden Oberfläche ermittelt wird.

Fig. 1



EP 0 197 266 A2

gleiche Titelseite

Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren, insbesondere der Desoxyribonucleinsäure (DNA) und der Ribonucleinsäure (RNA), sowie Träger zur Durchführung des Verfahrens und Verfahren zur Herstellung des Trägers

5 Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist ein doppelsträngiges Molekül mit zwei komplementären Ketten aus den vier Nucleotidbasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Die beiden Stränge der DNA sind über Wasserstoffbrückenverbindungen miteinander verknüpft, wobei sich bestimmte Basenpaare, nämlich Adenin-Thymin und Cytosin-Guanin zusammenfinden. Die der DNA verwandte RNA enthält 10 Ribose statt Desoxyribose und Uracil- statt Thyminresten. Die spezielle DNA-Verknüpfung zu zwei komplementären Ketten führt zu dem genetischen DNA-Code, welcher die genetische Information in allen lebenden Zellen, insbesondere der Chromosomen, darstellt. Bekannte Sequenzen von DNA oder RNA können in der Biotechnologie zur Darstellung der Sequenzen von unbekanntem genetischen Material oder zu Diagnosezwecken zur Identifizierung genetischen Materials aus Viren und Bakterien verwendet werden. Herkömmliche Verfahren zur Bestimmung von DNA- oder RNA-Hybridisierung beruhen auf der Bindung von radioaktiv oder enzymatisch markierten DNA- oder RNA-Sequenzen an komplementärem, einsträngigem DNA oder RNA und nachfolgender Erfassung 15 der Markierung. Als feste Phasen werden in den meisten Fällen Cellulose oder andere Polysaccharide zur Immobilisierung von DNA verwendet und wirken als Rezeptoren für die markierte DNA-Sonde.

Hierzu ist es beispielsweise bekannt, (E. M. Southern, J. Mol. Biol., 98, 25 503, 1975), Fragmente der DNA durch Elektrophorese in Agarosegel zu trennen und die getrennten Fragmente zu einzelnen Strängen zu denaturieren, welche

durch Diffusion auf Nitrocelluloseteile übertragen werden. Die getrennten Sequenzen werden dann identifiziert durch Inkubation radioaktiv markierter komplementärer Sequenzen, welche an ihre Targets gebunden werden. Das radioaktive Isotop wird dann lokalisiert durch Aktivierung einer photographischen Emulsion. Ferner ist bekannt (B. E. Noyes und G. R. Stark, Cell 5, 301, 1975), zum gleichen Zweck die denaturierte DNA bzw. RNA kovalent an Cellulose mittels einer Diazobenzylgruppe zu binden.

Sequenzen von DNA aus infektösen Mikroorganismen können als Sonden verwendet werden zur Erfassung von eventuell vorhandener komplementärer DNA in Proben von Serum, Mark, Fäkalstoffen oder dgl. zu Diagnosezwecken. Bislang werden hierzu radioaktiv oder enzymatisch markierte Sonden, die bekannte Nucleinsäuresequenzen aufweisen, verwendet.

15 Aufgabe der Erfindung ist es demgegenüber, ein Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäuren sowie einen hierfür verwendbaren Nachweisträger und ein Verfahren zur Herstellung dieses Trägers zu schaffen, bei welchen die Durchführung der Sequenzanalyse von Nucleinsäuren mit unmarkierten Sonden durchgeführt werden kann.

20

Diese Aufgabe wird gelöst durch die kennzeichnenden Merkmale der Ansprüche 1, 7 und 13, wobei in den Unteransprüchen Weiterbildungen der Erfindung gekennzeichnet sind.

Aus der DE-OS 23 30 702 ist ein Verfahren zum Nachweis spezifischer Proteine mit Hilfe eines an einen Träger gebundenen Antikörpers bekannt. Im Gegensatz dazu handelt es sich jedoch bei der Erfindung darum, daß eine zu untersuchende Nucleinsäure während der Analyse auf einem festen Träger immobilisiert wird, an den eine Nucleinsäure mit bekannter Sequenz chemisch gebunden ist und das Dickenwachstum der organischen Schicht gemessen wird.

Hierzu wird denaturierte einsträngige DNA bzw. RNA kovalent gebunden auf einer lichtreflektierenden Oberfläche des Trägers, und dieser Träger wird 10 als Nachweismedium mit der zu untersuchenden Probe, welche denaturierte Nucleinsäure aufweist, deren Sequenz zu analysieren ist, in Berührung gebracht. Komplementäre denaturierte Nucleinsäure in der Probe wird an der am Träger vorhandenen, eine bestimmte Sequenz aufweisende einsträngige Nucleinsäure gebunden, wodurch durch optische Messung das Dickenwachstum 15 der sich dabei bildenden organischen Schicht, durch welche insbesondere die Reflexionseigenschaften der reflektierenden Trägeroberfläche verändert werden, nachweisbar ist. Dieser Nachweis kann dadurch erfolgen, daß Änderungen der Lichtpolarisation nach der Reflexion an der Trägeroberfläche oder Änderungen der Interferenzfarben ermittelt werden. Zur Überwachung des 20 Polarisationsverhaltens kann bevorzugt das in der europäischen Patentschrift 19 088 bzw. in der US-PS 43 32 476 beschriebene ellipsometrische Verfahren sowie die dort beschriebene ellipsometrische Vorrichtung zur Untersuchung der physikalischen Eigenschaften der Oberfläche einer Probe verwendet werden. Für den Nachweis der Änderung der Interferenzfarben des an der Trägerober- 25 fläche reflektierten Lichts infolge der aufgewachsenen organischen Schicht eignet sich ein Trägerkörper, auf dessen reflektierender Oberfläche eine

Doppelschicht, nämlich eine Reflexions-Antireflexionsschicht, vorhanden ist, auf welcher der Nucleinsäurestrang mit der bekannten Sequenz immobilisiert ist. Als derartiger Trägerkörper eignet sich insbesondere ein solcher, wie er in der DE-OS 32 15 484 beschrieben ist.

5

Ein geeigneter Trägerkörper, der bei der durchzuführenden Analyse mit der zu untersuchenden Probe als Nachweismedium in Berührung gebracht wird, besitzt bevorzugt eine Silicium- oder Aluminiumoberfläche, auf der ein Siliciumwasserstoff mit einer funktionellen Gruppe als Schicht aufgebracht ist.

10 An dieser Siliciumwasserstoffschicht wird dann der Nucleinsäurestrang mit der bekannten bzw. bestimmten Sequenz durch chemische Bindung, insbesondere kovalente Bindung, immobilisiert. In vorteilhafter Weise kann noch eine Zwischenschicht aus einem Polysaccharid, insbesondere Dextran, zur Immobilisierung der Nucleinsäure aufgebracht werden.

15

Von Vorteil ist bei der Erfindung, daß die Nucleinsäuresonden, welche die Nucleinsäure mit bekannter Eigenschaft, insbesondere Sequenz, enthalten, für den nachfolgenden Nachweis nicht mehr markiert werden müssen. Es können bei der Erfindung somit bekannte Proben mit unmarkierten Sonden untersucht 20 werden. Der hierzu erforderliche Trägerkörper läßt sich einfach herstellen und besitzt einen einfachen Aufbau. Die Nachweisreaktion läßt sich in einfacher Weise in einem Vergleichsellipsometer, wie es beispielsweise im europäischen Patent 19 088 bzw. in der US-PS 43 32 476 beschrieben ist, durchführen. In dieser Vorrichtung lassen sich komplementäre Sequenzen, die sich 25 an dem auf dem Träger befindlichen Nucleinstrang gebildet haben, visuell sichtbar machen und damit nachweisen und bestimmen. Der Träger wird dabei in der bekannten ellipsometrischen Vorrichtung als Probe eingesetzt. Man

benötigt daher bei der Erfindung einen relativ geringen apparativen Aufbau im Gegensatz zu den bislang bekannten Verfahren.

Die reflektierende Trägeroberfläche besteht bevorzugt aus Siliciumdioxid 5 oder Aluminiumoxid. Auf diese ist eine Schicht eines Siliciumwasserstoffs aufgebracht, der eine funktionelle Endgruppe enthält. Hierfür eignet sich insbesondere eine Amino( $\text{NH}_2^-$ )- oder eine Epoxy( $\text{CH}_2-\text{CH}-$ )-Gruppe. Die Bindung der Siliciumwasserstoffschicht an der reflektierenden Oberfläche erfolgt spontan an Silanolgruppen bzw. Aluminiumhydroxylgruppen. Die denaturierte 10 Nucleinsäure (DNA bzw. RNA) mit einer bestimmten bekannten Verknüpfungsfolge werden chemisch, insbesondere kovalent, über eine Diazobenzylgruppe direkt an die Siliciumwasserstoffschicht oder über eine Zwischenschicht aus einem Polysaccharid, beispielsweise Dextran, gebunden.

15 Die Probe wird vor der Analyse denaturiert, beispielsweise in 0,5 M Natriumhydroxid oder dgl. und anschließend neutralisiert, und nachfolgend wird noch ein Hybridisierungspuffer zugegeben, dessen Zusammensetzung eine langsame Verknüpfung der komplementären Nucleinsäurestränge, insbesondere der DNA- bzw. RNA-Stränge ermöglicht. Dieser Puffer kann beispielsweise aus 20 50 % Formamid, 0,05 M Natriumcitrat, 0,1 % Dodecylsulfat, 1 mM EDTA (Ethylen-diamintetraessigsäure) bzw. deren Na-Salz, 0,02 % Albumin und 2 % Dextran-sulfat bestehen. Die Verknüpfung der komplementären Nucleinsäure aus der Probe mit dem kovalent am Träger immobilisierten Nucleinsäure äußert sich im Anwachsen der Dicke der dabei auf der Trägeroberfläche gebildeten organischen Schicht. Nach Spülen mit einer Kochsalzlösung und Wasser und anschließendem Trocknen lässt sich die Dicke der aufgewachsenen organischen Schicht, 25

wie schon erwähnt, mit Hilfe der Vergleichsellipsometrie (US-PS 43 32 476 oder EP 19 088) oder durch Messung der Änderung der Interferenzfarben von aus Siliciumoxiden bestehenden Doppelschichten an reflektierenden Trägerkörpern, wie sie beispielsweise in der DE-OS 32 15 484 beschrieben sind, ermitteln bzw. messen.

Im folgenden werden Ausführungsbeispiele zur Herstellung eines Trägers, welcher als Nachweismedium bei der Sequenzanalyse von Nucleinsäuren verwendet wird, im einzelnen beschrieben. Diese Träger besitzen eine lichtreflektierende Trägeroberfläche, auf welcher die denaturierte DNA oder RNA durch kovalente Bindung aufgebracht ist.

#### Beispiel 1

15 Ein Siliciumplättchen oder Glasplättchen bzw. -scheibchen, auf welches Silicium oder Aluminium beispielsweise durch Aufdampfen aufgebracht ist, wird in einem Exsikkator angeordnet, der mit einem Einlaßhahn und einem Auslaßhahn versehen ist. Der Druck im Innern des Exsikkators wird auf etwa 10 mm Hg verringert und die Temperatur auf 80° C gehalten. Ein Kolben, der Epoxysiliciumwasserstoff enthält, wird an den Einlaß des Exsikkators angeschlossen, und der Einlaßhahn am Exsikkator wird geöffnet. Der Siliciumwasserstoff wird dabei auf der Oberfläche des mit Silicium bzw. Aluminium beschichteten Silicium- bzw. Glaskörpers durch Destillation aufgebracht, wobei innerhalb von etwa zwei Stunden eine epoxy-aktivierte Oberfläche entsteht. Die beschichteten Körper werden dann in eine Lösung von 12 % 2-Aminotiophenol in Aceton eingetaucht und über einen längeren Zeitraum, etwa 10 Stunden, in einem Inkubator aufbewahrt. Anschließend werden die beschichteten Körper gewaschen

und bis zu ihrer weiteren Verwendung in Wasser aufbewahrt. Die beschichteten Körper werden dann in 1 M Salzsäure, welche 250  $\mu$ g/ml Natriumnitrid aufweist, eine Stunde bei 4° C eingetaucht, gewaschen und in einer Feuchtekammer aufbewahrt. Isolierte reine DNA wird in 25 mM Phosphatpuffer gelöst, auf 90° C erhitzt, ein dem vierfachen Volumen der vorhandenen Lösung entsprechendes Volumen an Dimethylsulfoxid wird zugesetzt und im Zeitraum von etwa 10 Stunden tropfenweise auf die Schichtkörperoberfläche aufgebracht und gezüchtet. Die plättchenförmigen Schichtkörper werden dann wieder gewaschen und in einer Lösung von Albumin (10  $\mu$ g/ml) in einem Phosphatpuffer durch Inkubation nach 10 behandelt, um die Oberfläche für unspezifische Adsorption zu inaktivieren.

Beispiel 2

Die Trägerplättchen werden mit Epoxysiliciumwasserstoff oder Aminosilicium-15 wasserstoff wie im Beispiel 1 behandelt. Anschließend wird Dextran an die epoxy- bzw. aminoaktivierte Oberfläche durch Inkubation in einer 20 %-Lösung von Dextran in Wasser gebunden. Hierdurch entsteht ein 20 bis 40 Å dicker Oberzug aus Dextran auf der Oberfläche. Alternativ hierzu kann Dextran durch Inkubation mit 0,01 % Natriumperjodat bei pH 8,0, welches in einer Sepha-20 dex-G25-Säule entsalzt ist, auf der mit Aminosiliciumwasserstoff beschichteten Oberfläche während etwa 10 Stunden gezüchtet werden. Das gebundene Dextran wird dann stabilisiert durch Inkubation mit einer 0,1 %igen Natriumborhydrid-Lösung in 0,1 M Acetatpuffer bei pH 5,0. Anschließend wird 0,1 M Natriumhydroxid (10 ml) und 1,4 Butandioldiglycidylether (1 ml) auf die platten-25 förmigen Trägerkörper im Zeitraum von etwa 10 Stunden aufgebracht, und anschließend wird ebenfalls in einem Zeitraum von etwa 10 Stunden 12 % 2-Amino-

thiophenol in Aceton den Trägerplättchen zugegeben. Die Trägerplättchen werden dann in Wasser aufbewahrt. Isolierte und reine DNA oder RNA wird dann nach einer Nitridbehandlung der Platten wie im Beispiel 1 auf die Trägerplättchen aufgebracht.

5

Beispiel 3

Die Trägerplättchen werden mit einer 20 bis 40  $\text{\AA}$  dicken Schicht aus Dextran, wie im Beispiel 2 beschrieben, beschichtet. Die mit Dextran beschichteten 10 Trägerplättchen werden dann zur Inkubation mit einer Lösung aus 0,2 g Natriumacetat in Wasser (10 ml), welches auch 1 g 1-((m-Nitrobenzyloxy)methyl)pyridiniumchlorid behandelt, anschließend in einem Ofen bei  $70^0\text{C}$  getrocknet und dann bei  $140^0\text{C}$  während etwa einer Stunde gebacken. Die Trägerplättchen werden dann zur Inkubation in einer 20 %igen Lösung von Natriumdithionid 15 behandelt und mit Wasser gewaschen. Ferner werden dann die Trägerplättchen in 1 M Salzsäure, welche 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Natriumnitrid aufweist, etwa eine Stunde lang bei  $4^0\text{C}$  eingetaucht, gewaschen und in einer Befeuchtungskammer aufbewahrt. Abschließend wird dann isolierte, reine DNA bzw. RNA gelöst und durch 20 Züchtung, wie im Beispiel 1 beschrieben, auf die vorstehend behandelten Trägerplättchen aufgebracht.

Im folgenden werden anhand der beiliegenden Figuren Ausführungsbeispiele für bei der Sequenzanalyse von Nucleinsäure verwendbaren Trägern beschrieben.

25 Bei den in den Figuren 1 bis 3 dargestellten Ausführungsbeispielen handelt es sich um schematische Darstellungen der in Form von Plättchen ausgebildeten

Träger, wobei lediglich die Reihenfolge der Anordnung der einzelnen Schichten auf dem Grundkörper veranschaulicht werden soll, ohne daß die Verhältnisse der Schichtdicken der dargestellten Schichtdicken den in der Praxis vorhandenen Maßstäben entsprechen.

5

In der Fig. 1 befindet sich auf einem Trägergrundkörper 1, der beispielsweise aus Silicium oder Glas bestehen kann, eine Siliciumdioxidschicht 2, welche auch eine Aluminiumoxidschicht sein kann, die als reflektierende Oberfläche wirkt. Auf dieser Schicht befindet sich eine Schicht 3 aus Siliciumwasserstoff mit funktionellen Epoxy- oder Aminogruppen. Darüber befindet sich die Schicht 4, in welcher die auf dem Träger immobilisierte bzw. fixierte einsträngige Nucleinsäure, beispielsweise DNA, vorhanden ist.

Das Ausführungsbeispiel des in der Fig. 2 dargestellten Trägers entspricht 15 im wesentlichen dem in der Fig. 1 und unterscheidet sich demgegenüber lediglich dadurch, daß zwischen der Siliciumwasserstoffschicht 3 und der Schicht 4 mit der fixierten denaturierten einsträngigen Nucleinsäure eine Polysaccharidschicht 5, insbesondere aus Dextran, angeordnet ist.

20 Bei dem in der Fig. 3 dargestellten Ausführungsbeispiel ist die reflektierende Oberfläche zweischichtig ausgebildet, wobei die auf dem Grundkörper 1 aufliegende erste Schicht 2' aus Siliciummonoxid und die zweite Schicht 2 aus Siliciumdioxid besteht. Die Wirkungsweise dieser Doppelschicht ist im einzelnen in der DE-OS 32 15 484 beschrieben.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Sequenzanalyse von Nucleinsäure, insbesondere der Desoxyribonucleinsäure (DNA) oder Ribonucleinsäure (RNA), bei dem die zu untersuchende Nucleinsäure während der Analyse auf einem festen Träger immobilisiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende flüssige Probe, welche denaturierte Nucleinsäure aufweist, mit einer lichtreflektierenden Oberfläche des Trägers, an den ein Nucleinsäurestrang mit bestimmter Sequenz chemisch gebunden ist, in Berührung gebracht wird, wobei sich komplementäre Sequenzen der in der Probe vorhandenen denaturierten Nucleinsäure mit dem an der Trägeroberfläche vorhandenen Nucleinsäurestrang durch Hybridisierung vereinigen, und daß das Dickenwachstum der sich dabei auf der Trägeroberfläche bildenden organischen Schicht optisch bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Dickenwachstum aus den Änderungen der Reflexionseigenschaften der reflektierenden Trägeroberfläche bestimmt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Dickenwachstum durch ellipsometrische Messung bestimmt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Dickenwachstum durch Interferenzmessung bestimmt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Dickenwachstum durch Vergleichsellipsometriemessung bestimmt wird.

5 6. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Dickenwachstum aus Interferenzänderungen bei der Reflexion von Licht an einer reflektierenden Oberfläche, die eine aus Siliciumoxid und Siliciumdioxid bestehende Doppelschicht aufweist, bestimmt wird.

10 7. Träger zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägeroberfläche lichtreflektierend ausgebildet ist, und der eine bestimmte Sequenz aufweisende Nucleinsäurestrang durch chemische Bindung an der Trägeroberfläche haftet.

15

8. Träger nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Nucleinsäurestrang durch kovalente Bindung an der Trägeroberfläche haftet.

20 9. Träger nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerkörper aus Silicium oder Glas besteht.

10. Träger nach einem der Ansprüche 7 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Trägerkörper an seiner lichtreflektierenden Oberfläche eine Siliciumdioxid- oder Aluminiumoxidschicht auf-

25

weist, auf der eine Schicht aus funktionellem Siliciumwasserstoff sich befindet, an welchem der Nucleinsäurestrang kovalent gebunden ist.

11. Träger nach einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Nucleinsäurestrang über eine Polysaccharidzwischenschicht an der reflektierenden Trägeroberfläche kovalent gebunden ist.

12. Träger nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Siliciumwasserstoff als funktionelle Gruppen Amino- oder Epoxygruppen aufweist.

13. Verfahren zur Herstellung eines Trägers nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein eine funktionelle Gruppe aufweisender Siliciumwasserstoff auf die reflektierende Oberfläche des Trägers aufdestilliert wird und anschließend darauf der Nucleinsäurestrang aus einer Pufferlösung, in welcher die reine Nucleinsäure gelöst ist, gezüchtet wird.

20 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Aufbringen des Nucleinsäurestrangs auf die aktivierte Siliciumwasserstoffsicht durch Züchtung aus einer wäßrigen Lösung eine Polysaccharidschicht aufgebracht wird.

M 17-00-86

0197266

1/1

Fig.1

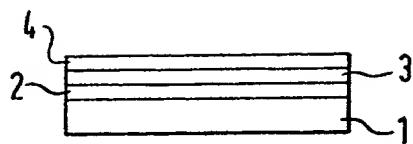


Fig.2

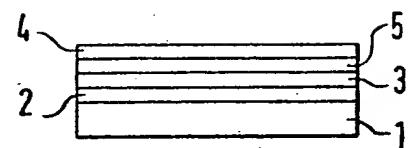
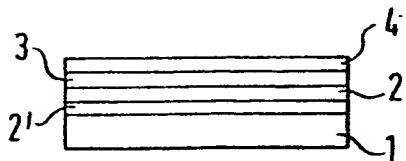


Fig.3





English Translation of Granted EP Patent Corresponding to EP 0197266



A METHOD OF SEQUENCE ANALYSIS OF NUCLEIC ACIDS

Deoxyribonucleic acid (DNA) is a double-strand molecule having two complementary chains made up of the 5 four nucleotide bases adenine, cytosine, guanine and thymine. The two strands of the DNA are joined together by hydrogen bonds, wherein particular base pairs, namely adenine-thymine and cytosine-guanine come together. The RNA, which is related to DNA, contains ribose instead of 10 deoxyribose and uracil instead of thymine groups. The specific DNA-bonding forming two complementary chains leads to the genetic DNA code, which represents the genetic information in all living cells, in particular the chromosomes. Known sequences of DNA or RNA may be used in 15 biotechnology for preparing the sequences of unknown genetic material or for diagnostic purposes for identifying genetic material composed of viruses and bacteria. Usual methods for determining DNA- or RNA-hybridization are based upon the bonding of radioactivity 20 or enzymatically labelled DNA- or RNA-sequences to complementary, single-stranded DNA or RNA and subsequent detection of the labelling. In most cases cellulose or other polysaccharides are used as solid phases for immobilizing DNA and act as receptors for the labelled DNA 25 probe.

Herein it is known (E.M. Southern, J. Mol. Biol., 98, 503, 1975), for example to separate fragments of DNA, for example, by electrophoresis in agarose gel and to denaturize the separated fragments to single strands which 30 are transferred by diffusion to nitrocellulose portions. The separated sequences are then identified by incubation of radioactively labelled complementary sequences, which are bound to their targets. The radioactive isotope is then localized by activating a photographic emulsion. 35 Furthermore, it is known (B.E. Noyes and G.R. Stark, Cell., 5, 301, 1975) to bind the denaturized DNA or RNA

covalently to cellulose by means of a diazobenzyl group for the same purpose.

Sequences of DNA from infectious microorganisms can be used as probes for determining any complementary DNA 5 which may be present in samples of serum, marrow, faecal substances or the like for diagnostic purposes. Up to the present, radioactively or enzymatically labelled probes having known nucleic acid sequences are used for this purpose.

10 In EP-A-70 687 has been described a method for sequence analysis of DNA according to the preamble of claim 1 in which a nucleic acid strand of a sample is immobilized on a support. Complementary nucleic acid strands with known sequence are brought into contact with 15 said nucleic acid strand, complementary sequences combining by hybridization. After separating the segments not bonded, the labeling substances are activated so that the light produced in the process is optically observed and used to detect the hybridization. The nucleic acid 20 sequences on the support are here immobilized, for instance, by means of activated glass surfaces, polyacrylamide, agarose, cellulose, etc., said immobilization entirely resulting by absorption forces.

In the European application EP-A-92 688 has been 25 described a method and a support for detecting a biochemical substance in an immunological process. An antigen is immobilized on a support of glass, silicon or plastic which has a reflecting surface consisting of a double layer of silicon oxide and silicon dioxide and is 30 brought into contact with a liquid sample which contains the corresponding antibody. In the bonding of the antibody on the immobilized antigen an organic layer originates on the support surface. The increase in thickness of said layer is determined from interference 35 changes in the reflection of light on the reflecting surface. An application of said method to a sequence analysis does not result from said publication.

It is the object of the present invention, with respect to the foregoing, to provide a method for sequence analysis of nucleic acids, as well as a detection support usable therein.

5 This object is achieved by means of the characterizing features of the claims 1, 7 and 11, wherein further developments of the present invention are characterized in the dependent claims.

10 A method for detecting specific proteins with the aid of an antibody bound to a support is known from DE-OS 23 30 702. Contrary to this, however, the present invention is concerned with immobilizing a nucleic acid being examined during analysis on a solid support, to which a nucleic acid having a known sequence is chemically bound, 15 and measuring the increase of thickness of the organic layer.

20 For this, denaturized single-strand DNA or RNA is covalently bound on a light-reflecting surface of the support, and the support, as a detection medium, is brought into contact with the sample to be examined, which contains the denaturized nucleic acid, the sequence of 25 which is to be analysed. Complementary denaturized nucleic acid in the sample is bound to the single strand nucleic acid of a particular sequence, which is present on the support, whereby the increase of thickness of the organic layer, which is formed thereby and which particularly changes the reflection properties of the reflecting support surface, becomes detectable by optical 30 measurement. This detection can be made by determining the changes of the polarization of light after reflection at the support surface or changes of the interference colours. For monitoring the polarization behaviour, the ellipsometric method described in the European Patent Specification 19 088 or in the US Patent Specification 4 35 332 476, and the ellipsometric apparatus, also described therein, for investigating the physical properties of the surface of a sample may preferably be used. For detecting

the change, caused by the grown organic layer, of the interference colour of the light reflected at the support surface, a support body is suitable, having present on the reflecting surface thereof a double layer, namely a 5 reflection-antireflection layer, on which the nucleic acid strand of known sequence is immobilized. A particularly suitable support body of this kind is as described in DE-OS 32 15 484.

10 A suitable support body, which is contacted, as a detection medium, with the sample to be examined during the analysis to be carried out, preferably has a silicon or aluminum surface, onto which a silicon hydride having a functional group is applied as a layer. The nucleic acid strand having the known or determined sequence is 15 then immobilized by chemical bonding, in particular covalent bonding, on this silicon hydride layer. It is of advantage to apply also an intermediate layer consisting of a polysaccharide, in particular dextrane, to immobilize the nucleic acid.

20 The present invention provides the advantage that the nucleic acid probes, which contain the nucleic acid of known properties, in particular sequence, need no longer be labelled for the subsequent detection. Thus, with the present invention, known samples can be examined using 25 unlabelled probes. The support body needed for this may be produced simply and is of simple structure. The detection reaction may be performed in simple manner in a comparison ellipsometer, as described for example in the European Patent 19 088 or in the US Patent Specification 30 4 332 476. In this apparatus, complementary sequence, which have formed on the nucleic strand located on the support, can be made visible and thus detected and determined. For this, the support is inserted as a sample in the known ellipsometric apparatus. Contrary to the 35 case of previously known methods, apparatus of relatively unelaborate construction is needed with the present invention.

The reflecting support surface preferably consist of silicon dioxide or aluminum oxide. Onto this is applied a layer of a silicon hydride having a functional end group. Especially suitable for this is an amino ( $\text{NH}_2-$ ) or an epoxy ( $\text{CH}_2^0-\text{CH}-$ ) group. The bonding of the silicon hydride layer to the reflecting surface occurs spontaneously at silanol groups or aluminum hydroxyl groups. The denaturized nucleic acid (DNA or RNA) having a particular, known bonding sequence is bonded chemically, 5 in particular covalently, to the silicon hydride layer through a diazobenzyl group directly or through an intermediate layer consisting of a polysaccharide, for 10 example dextrane.

Before analysis the sample is denaturized, for 15 example in 0.5 M sodium hydroxide or the like, and subsequently neutralized, and then a hybridization buffer is added, the composition of which renders possible a slow bonding of the complementary nucleic acid strand, in particular the DNA or RNA strands. This buffer may 20 consist, for example, of 50% formamide, 0.05 M sodium citrate, 0.1% dodecyl sulfate, 1mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) or the sodium salt thereof, 0.02% albumin and 2% dextrane sulfate. The bonding of the complementary nucleic acid of the sample to the nuclein 25 strand immobilized covalently on the support leads to a growth of the thickness of the organic layer formed thereby on the surface of the support. After rinsing with a common salt solution and water and subsequent drying, the thickness of the grown organic layer may be determined 30 or measured, as already mentioned, by means of comparative ellipsometry (US-Patent Specification 4 332 476 or European Patent 19 088) or by measurement of the change of the interference colours of double layers consisting of silicon oxides on reflecting support bodies, as described 35 for example in DE-OS 32 15 484.

There follows a detailed description of working examples of the production of a support, which is used as

a detection medium in the sequence analysis of nucleic acids. These supports have a light-reflecting support surface, on which a coating of denaturized DNA or RNA is covalently bonded.

5       Example 1

A silicon platelet or glass platelet or wafer, onto which silicon or aluminum has been coated, for example by vapour deposition, is arranged in an exsiccator provided with an inlet tap and an outlet tap. The pressure within 10 the exsiccator is reduced to about 10 nm Hg and the temperature is kept at 80°C. A flask containing epoxy silicon hydride is connected to the inlet of the exsiccator and the inlet tap of the exsiccator is opened. The silicon hydride is thereby applied by distillation to 15 the surface of the silicon or glass body which has been coated with silicon or aluminum, whereby an epoxy-activated surface is formed within about two hours. The coated bodies are then immersed in a solution of 12% 2-amino-thiophenol in acetone and stored for a long time, 20 i.e. about ten hours, in an incubator. The coated bodies are then washed and stored in water until used. The coated bodies are then immersed in 1M hydrochloric acid containing 250 ug/ml sodium nitrite for one hour at 4°C, washed and stored in a humidity chamber. Isolated pure 25 DNA is dissolved in 25 mM phosphate buffer and heated to 90°C, a volume of dimethyl sulfoxide corresponding to the fourfold volume of the existing solution is added, and the solution is applied dropwise for a period of about ten hours to the surface of the stratified body and incubated. 30 The platelet-shaped stratified bodies are then washed again and posttreated by incubation in a solution of albumin (10 ug/ml), to deactivate the surface to unspecific adsorption.

35       Example 2

The support platelets are treated with epoxy silicon hydride or amino silicon hydride as in Example 1. Then dextrane is bonded to the epoxy or amino activated surface

by incubation in a 20% solution of dextrane in water. This results in a coating of dextrane of 20 to 40 Å thickness on the surface. Alternatively, dextrane can be grown on the surface coated with amino silicon hydride 5 during about ten hours by incubation with 0.01% sodium periodate at pH 8.0, which has been desalinated in a Sephadex G 25 column. The bound dextrane is then stabilized by incubation with a 0.1% sodium borohydride solution in 0.1 M acetate buffer at pH 5.0. The 0.1 M 10 sodium hydroxide (10 ml) and 1,4-butanediol diglycidylether (1 ml) are coated onto the plate-shaped support body during a period of about ten hours, and subsequently 12% 2-amino-thiophenol in acetone is added to the support platelets, also during a period of about ten 15 hours. The support platelets are then stored in water. Isolated and pure DNA or RNA is then applied to the support platelets following a nitrite treatment as in Example 1.

Example 3

20 The support platelets are then treated for incubation with a solution of 0.2 g sodium acetate in water (10 ml), which also contains 1 g 1-((m-nitrobenzyloxy)methyl)pyridinium chloride, subsequently dried in an oven at 70°C and then at 140°C for the duration 25 of about one hour. The support platelets are then incubated in a 20% solution of sodium dithionite and washed with water. Furthermore, the support platelet are then immersed for about one hour at 4°C in 1 M hydrochloric acid containing 250 ug/ml sodium nitrite, washed and 30 stored in a moistening chamber. Finally, isolated pure DNA or RNA is dissolved and applied to the above-treated support platelets by incubation, as described in Example 1.

35 Examples of embodiment of supports usable in the sequence analysis of nucleic acid are described hereunder with the aid of the accompanying Figures.

The Figures 1 to 3 are schematic representations of examples of embodiments of support in the form of platelets, wherein only the order of arrangement of the individual layers on the base body is illustrated, without 5 the shown relationships of the layer thicknesses corresponding to the scale applying in practice.

In Figure 1 a silicon dioxide layer 2, which may also be an aluminum oxide layer, acting as a reflecting surface is located on a support base body 1, consisting of silicon 10 or glass, for example. On this layer there is a layer 3 of silicon hydride having functional epoxy or amino groups. On top of this is the layer 4, in which the single strand nucleic acid, for example DNA, is present, being immobilized or fixed on the support.

15 The example of embodiment of the support shown in Figure 2 corresponds substantially to that of Figure 1 and differs therefrom only in that a polysaccharide layer 5, in particular of dextrane, is arranged between the silicon hydride layer 3 and the layer 4 having the fixed 20 denaturized single strand nucleic acid.

In the example of embodiment shown in Figure 3 the reflecting surface is formed to be double-layered, wherein the first layer 2' lying on the base body 1 consists of silicon monoxide, and the second layer 2 consists of 25 silicon dioxide. The function of this double layer is described in detail in DE-OS 32 15 484.

1. A method of sequence analysis of nucleic acid, in particular deoxyribonucleic acid (DNA) or ribonucleic acid (RNA), wherein a liquid sample to be examined, which includes denaturized nucleic acid, is contacted with the  
5 light reflecting surface of a support, to which a nucleic acid strand having a particular sequence is chemically bound and wherein the hybridization of complementary sequences of the denaturized nucleic acid present in the sample and the nucleic acid strand present at the support  
10 surface is determined optically, characterized in that the nucleic acid strand having the particular sequence is bound to the support (1) by covalent bonding, and that the increase of thickness of the organic layer formed by the hybridization on the support surface is determined  
15 optically.

2. A method according to claim 1, characterized in that the increase of thickness is determined from the change of the reflection properties of the reflecting support surface.

20 3. A method according to claim 1, characterized in that the increase of thickness is determined by ellipsometric measurement.

4. A method according to claim 2, characterized in that the increase of thickness is determined by  
25 interference measurement.

5. A method according to claim 3, characterized in that the increase of thickness is determined by comparative ellipsometric measurement.

6. A method according to claim 4, characterized in  
30 that the increase of thickness is determined from changes of interference during the reflection of light at a reflecting surface having a double layer consisting of silicon oxide and silicon dioxide.

7. A support for use in performing the method of  
35 sequence analysis of nucleic acid, particular deoxyribonucleic acid (DNA) or ribonucleic acid (RNA) according to one of the preceding claims, wherein a

nucleic acid strand having a particular sequence is chemically bound to the surface of the support and is contacted with a liquid sample to be examined, which includes denaturized nucleic acid, whereby complementary sequences of the denaturized nucleic acid present in the sample unite by hybridization with the nucleic acid strand present at the support surface, characterized in that the nucleic acid strand having the particular sequence adheres to the light-reflecting support surface by covalent bonding.

10 8. A support according to claim 7, characterized in that the nucleic acid strand is covalently bound to the reflecting support surface through a polysaccharide intermediate layer (5).

15 9. A support according to claim 7 or 8, characterized in that the support body (1) has on its light-reflecting surface a silicon dioxide or aluminum oxide layer (2), on which a layer (3) of functional silicon hydride is located, to which the nucleic acid 20 strand is covalently bound.

10. A support according to claim 9, characterized in that the silicon hydride has amino or epoxy groups as functional groups.

11. A method for producing a support according to 25 claim 7, characterized in that a silicon hydride having a functional group is distilled onto the reflecting surface of the support (1), that a polysaccharide layer is applied from an aqueous solution onto the activated silicon hydride layer by incubation and that subsequently the 30 nucleic acid strand is incubated thereupon from a buffer solution in which the pure nucleic acid is dissolved.

Fig.1

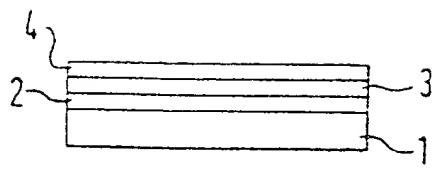


Fig. 2

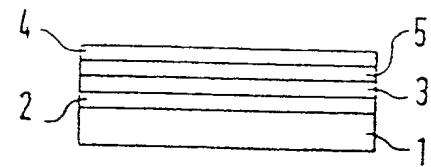
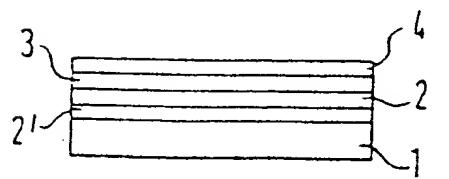


Fig. 3



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**